



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenl gungsschrift
⑩ DE 195 06 633 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶: AT
C 07 K 14/745
C 07 K 1/16
C 07 K 1/30

②1 Aktenzeichen: 195 06 633.2
②2 Anmeldetag: 25. 2. 95
④3 Offenlegungstag: 29. 8. 96

DE 195 06 633 A 1

⑦1 Anmelder:
Octapharma AG, Ziegelbrücke, CH

⑦4 Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦2 Erfinder:
Josic, Djuro, Dr., Wien, AT; Hoffer, Lutz, Dr., Baden,
AT; Morfeld, Frank, Dr., 67560 Eschborn, DE

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Faktor IX aus biologischen Quellen

⑤7 Verfahren zur Herstellung von Faktor IX aus biologischen
Quellen mittels Chromatographie, dadurch gekennzeichnet,
daß vor chromatographischer Trennung die Quelle mit
einem Protein-Fällungsmittel behandelt wird.

DE 195 06 633 A 1

Beschreibung

Gegenstand der folgenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Faktor IX aus biologischen Quellen mittels Chromatographie sowie Faktor IX erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Bei der Herstellung von Faktor IX aus beispielsweise Blutplasma wird zunächst das Cryopräzipitat abgetrennt. Das gefroren Citratplasma wird aufgetaut, wobei die Hauptmenge an Faktor VIII und Fibrinogen durch Zentrifugation abgetrennt wird. Das so erhaltene Cryopoorplasma enthält die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren mit einer Aktivität, die in der Größenordnung von 0,01 IU/mg Protein liegt.

Nach dem aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren werden die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ohne Beeinträchtigung der Albumingewinnung durch Extraktion mit Anionenaustauschern, wie beispielsweise DEAE-Sephadex gebunden. Wegen der schlechten Flußeigenschaften von DEAE-Sephadex muß dies r Schritt jedoch üblicherweise als Festphasenextraktion im batch-Verfahren durchgeführt werden. Die nach der Elution des DEAE-Sephadex anfallenden Fraktionen dienen dann als Ausgangsmaterial für die Faktor IX Reinigung. In dieser Fraktion werden allerdings auch im Plasma enthaltende Proteasen angereichert, so daß es durch proteolytischen Abbau zu Ausbeuteverlusten an dem interessierenden Faktor IX kommt und das Risiko der Thrombogenität der Präparation zunimmt.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren anzugeben, daß die genannten Risiken vermindert, und zwar ohne Zusatz von Proteasehemmern.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs. Die den Faktor IX enthaltende biologische Quelle wird dabei mit einem Protein-Fällungsmittel behandelt. Als biologische Quelle kommt insbesondere Blutplasma oder an Faktor VIII und Fibrinogen abgereichertes Cryopräzipitat (Cryopoorplasma) in Frage.

Die Konzentration des Protein-Fällungsmittels liegt insbesondere bei 1,5 bis 2,3 mol/l, vorzugsweise 1,75 bis 1,9 mol/l. Die Angaben beziehen sich auf die Protein-Fällungsmittel-Konzentrationen, die in der Faktor IX enthaltenden Quellen vorliegen (Endkonzentration).

Als Protein-Fällungsmittel kommt insbesondere Ammoniumsulfat in Betracht.

Das erfindungsgemäße Verfahren verringert die proteolytische Aktivität um mindestens eine Größenordnung. Desweiteren wird durch den Präzipitationsschritt vor der eigentlichen chromatographischen Reinigung des Faktors IX störende Bestandteile wie Faktor VII und Faktor II entfernt. Auch die Proteine C und S werden abgereichert. Im Falle des Faktors VII kann eine fast vollständige Elimination erreicht werden. Faktor II wird ebenfalls sehr vollständig (70 bis 90%) abgereichert, wohingegen die Abreicherung an Protein C und S etwa 50% beträgt.

Im Überstand der Fraktion, die mit dem Protein-Fällungsmittel behandelt wurde, beträgt die Faktor IX-Aktivität typischerweise 20 bis 30 IU/ml entsprechend einer spezifischen Aktivität von 1 bis 5 IU/mg.

An den erfindungsgemäßen Präzipitationsschritt, vorzugsweise mit Ammoniumsulfat, schließt sich dann die chromatographische Trennung der an Faktor IX angereicherten Fraktion an. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, daß Proteine bei hohen Salzkonzentrationen unterschiedlich stark ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können. Erfindungsgemäß wird vorzugsweise der Faktor IX in Gegenwart relativ hoher Salzkonzentrationen, die aus der Protein-Fällung vorhanden sind, an ein Chromatographie-Material gebunden, das für die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) einsetzbar ist. Damit wird gleichzeitig die hohe Salzkonzentration, die durch die Protein-Fällung bedingt ist, verringert. Es kommt insbesondere ein Chromatographie-Material in Frage, das auf dem Trägermaterial einen hydrophilen beweglichen Arm (Tentakel) gebunden hat. An diese Spacer sind dann die entsprechenden Liganden, insbesondere hydrophobe Liganden, wie Propyl-, Butyl-, Phenyl-Gruppen, kovalent gebunden.

Der Überstand der Fraktion, die mit dem Protein-Fällungsmittel behandelt worden ist, wird auf das entsprechende Chromatographie-Material aufgetragen und gegebenenfalls gewaschen. Die Elution des an der Säule gebundenen, noch Faktor X enthaltenden Faktor IX kann mit einem Puffer erfolgen, der das Proteinpräzipitationsmittel in geringerer Konzentration enthält. Dadurch ist die Ionenstärke der Elutionslösung im Vergleich zur Auftragslösung reduziert. Die aus der Chromatographie-Säule, enthaltend HIC-Material, eluierende Fraktion mit Faktor IX wird aufgefangen und weiteren Entsalzungsschritten mit geeigneten Mitteln unterzogen. Dies kann beispielsweise durch Ultraund/oder Diafiltration erfolgen.

Die weitere Trennung des Faktors IX, beispielsweise vom begleitenden Faktor X, erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durch eine Affinitäts-Chromatographie an einem Heparin modifizierten Träger. Bei relativ geringer Ionenstärke der die Faktoren enthaltende Lösung binden diese an das Chromatographie-Material. Gegebenenfalls störender Faktor X wird durch Behandeln mit einer Natriumchlorid enthaltenden Lösung in Konzentrationen von 150 bis 300 mmol/l erreicht. Unter diesen Bedingungen verbleibt der Faktor IX gebunden an dem Heparin-Affinitätsträger. Durch Erhöhung der Ionenstärke der wäßrigen Lösung auf in etwa das Doppelte, beginnt der Faktor IX sich von der Oberfläche des Affinitätsträgers zu lösen.

Durch chemische und/oder physikalische Verfahren kann eine Virusinaktivierung erfolgen. Die physikalische Virusinaktivierungsmethode besteht im wesentlichen aus einer Wärmebehandlung der entsprechenden Fraktion bei 60 bis 65°C für 5 bis 30 Stunden. Diese Wärmebehandlung kann sich insbesondere an die Heparin-Affinitäts-Chromatographie anschließen. Die chemische Virusinaktivierung besteht beispielsweise in einer Behandlung einer Faktor IX enthaltenden Fraktion mittels nicht-ionischen Tensiden und Di- oder Trialkylphosphaten. Insbesondere kommen hier Kombinationen von Tween und Tri-N-butylphosphat (TNBP) in Betracht. Virusinaktivierungsmethoden sind beschrieben in der EP 0 131 740 oder Horowitz et al. Blood, 79 (1992) 826.

Die Virusinaktivierungsmethoden können auch kombiniert werden, wie dies beschrieben ist in der WO 94/17834. Vorzugsweise wird die chemische Virusinaktivierung nach der Ultra/Diafiltration nach der hydrophoben Chromatographie durchgeführt.

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens läßt sich die Gesamtausbeute von Faktor IX mit hoher Reinheit auf 20 bis 30% bezogen aus Plasma steigern.

Die Figur zeigt das erfindungsgemäße Verfahren mit angeschlossenen chromatographischen Reinigungsschritten in Form eines Fließschemas. Dabei wird durch die Zeile angedeutet, welche Fraktionen abgetrennt werden und welche in den entsprechenden Eluat und Überständen verbleiben.

Das nachfolgende Beispiel verdeutlicht die Erfindung.

Gefrorenes Citratplasma wird aufgetaut und bei 0 bis 3°C gerührt. Faktor VIII und Fibrinogen werden durch Zentrifugation abgetrennt. Die erhaltene Cryopoorplasma-Fraktion enthält Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren mit einer spezifischen Aktivität von ca. 0,01 IU/mg Protein. Der nachfolgende Capture-Schritt beinhaltet eine Festphasenextraktion oder Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern. Hierbei werden IgG und Albumin abgetrennt. Die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren liegen in einer Aktivität von 10 bis 50 IU/ml vor, was einem Anreicherungsfaktor bezüglich Faktor IX von ca. 3500 entspricht.

An den Capture-Schritt wird nun die eigentliche Reinigung angeschlossen. Die nach dem Capture-Schritt anfallende Fraktion wird mit einer Ammoniumsulfat-Lösung versetzt, so daß sich eine Endkonzentration von etwa 1,9 mol/l ergibt. Die Proteine C/S werden zu ca. 50% entfernt, wohingegen Faktor II zu 70 bis 90% und Faktor VII fast quantitativ entfernt wird. Der nach der Ammoniumsulfat-Fällung erhaltene Überstand wird einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie an einem entsprechend modifizierten Tentakel-Gel unterzogen. Die Konzentration des Ammoniumsulfats in der Auftragslösung betrug ungefähr 1,75 mol/l. Der Auftragspuffer enthält auch Phosphat-Ionen. Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie führt zur Bindung von restlichem Faktor VII und Faktor IX. Faktor X bindet an dem Material zu 70 bis 80%. Die Elution des Faktors IX/Faktor X-Gemisches erfolgt mit einer 1,2 bis 1,4 mol/l enthaltenden Ammoniumsulfat-Lösung. Das eluierende Material ist frei von Faktor VII und weist keine wesentliche proteolytische Aktivität auf. Die spezifische Aktivität von Faktor IX in der Faktor IX/Faktor X-Mischung beträgt 5 bis 15 IU/mg Protein.

Das im Eluat befindliche Ammoniumsulfat wird durch Ultra- und Diafiltration entfernt. Die Virusinaktivierung mittels Detergenzien erfolgt durch Behandlung mit ca. 1% Tween 80/0,3% TNBP.

Danach wird die erhaltene Fraktion nach Abtrennung des Detergens einer Heparin-Affinitäts-Chromatographie unterzogen. Bei niedriger Osmolarität binden die Faktoren X und IX an das Heparin-Gel. Faktor X wird durch Waschen mit einem Puffer enthaltend 0,25 mol/l NaCl. Faktor IX eluiert nach Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration auf 0,45 mol/l. Im Eluat liegt Faktor IX danach mit 30 bis 50 IU/ml und eine spezifische Aktivität > 100 vor.

Die so erhaltene Fraktion enthaltend Faktor IX wird entsalzt und lyophilisiert.

5	Ausgangsmaterial:	Plasma/Cryopoor-Plasma	≈ 0,01
		↓	
10		- Fibrinogen ↓ - F VIII ↓	
	Capture:	DEAE-Ionenaustausch Festphasenextraktion o. Chromatographie	0,5-1
15		↓	
		- Ig ↓ - Albumin ↓	
20		Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren: 10 - 50 IU/ml Anreicherungsfaktor f. F IX: ≈ 3500	
	Aufreinigung:	Ammonsulfatfällung m. 1,75-1,9 mol/l	1-5
25		↓	
		- Protein C/S ↓	
30		Abreicherung F II: ≈ 80 % " F VII: ≈ 100 %	
	Elimination prot. Aktivität:	HIC-Tentakel-Chromatographie	5-15
35		↓	
		Abreicherung proteolytischer Aktivität: 100 % " F VII: 100 %	
40			
	Polishing:	Heparin-Affinitäts-Chromatographie	100-200
45		↓	
		Abreicherung F II: 100 % " F X: 100 %	
50		F IX Endkonzentration: 50 IU/ml Anreicherungsfaktor f. F IX: ≈ 8000	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Faktor IX aus biologischen Quellen mittels Chromatographie, dadurch gekennzeichnet, daß vor chromatographischen Trennungen die Quelle mit einem Protein-Fällungsmittel behandelt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologische Quelle Blutplasma oder durch Abtrennung des Cryopräzipitats an Faktor VIII und Fibrinogen abgereichertes Plasma (Cryopoorplasma) ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein-Fällungsmittel Ammoniumsulfat ist.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Protein-Fällungsmittel in einer Konzentration von 1,5 bis 2,3 mol/l (Endkonzentration) eingesetzt wird.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei nach der Protein-Fällung eine Entfernung des Protein-Fällungsmittels und Anreicherung des Faktors IX durch eine Adsorption des Faktors IX an ein Chromatographie-Material, das für die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) einsetzbar ist, erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das den Faktor IX adsorbiert habende chromatographische Material mit einer wäßrigen Lösung mit einer Ionenstärke, die zur Ablösung des Faktors IX von dem HIC-Material führt, behandelt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 und/oder 6, wobei die nach Ablösung des Faktors IX von dem HIC-Material erhältlichen Fraktionen einem Verfahrensschritt unterworfen werden, der die Salzkonzentration der den Faktor IX enthaltenden Lösung reduziert, z. B. durch Ultra-/Diafiltration.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei sich eine Affinitäts-Chromatographie an Heparin modifiziertem Trägermaterial anschließt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei eine Virusinaktivierung auf chemischem und/oder physikalischem Weg durchgeführt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die physikalische Virusinaktivierung eine Wärmebehandlung bei 60 bis 65°C für 5 bis 30 Stunden umfaßt, insbesondere nach der Affinitäts-Chromatographie an Heparin gemäß Anspruch 8.

11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die chemische Virusinaktivierung eine Behandlung der Faktor IX enthaltenden Probe mit nicht-ionischen Detergenzien/di- oder trialkylierten Phosphaten umfaßt.

12. Faktor IX erhältlich nach einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -